

レゾルシノールとの縮合反応を利用するアルデヒド類の蛍光光度定量

中原良介,* 原 小百合, 村上沙織, 大木正伸,
松村有里子, 藤本 剛, 山口敬子, 藤田芳一

**Fluorophotometric Determination of Aldehyde by Utilizing
Condensation Reaction with Resorcinol**

Ryosuke NAKAHARA,* Sayuri HARA, Saori MURAKAMI, Masanobu OKI,
Yuriko MATSUMURA, Tsuyoshi FUJIMOTO, Takako YAMAGUCHI, and Yoshikazu FUJITA
Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1 Nasahara, Takatsuki Osaka 569-1094, Japan

(Received October 29, 2008; Accepted December 22, 2008; Published online January 16, 2009)

A simple and sensitive fluorophotometric method for the determination of aldehyde was established by utilizing condensation reaction with resorcinol. In the determination of vanillin that is one of aldehydes, the calibration curve exhibited linearity over the vanillin concentration range of 3.0–7600 ng ml⁻¹ at an emission wavelength of 507 nm with an excitation of 410 nm and with the relative standard deviations (*n*=5) of 2.5%, 2.0% for 7.6 ng ml⁻¹, 760 ng ml⁻¹ of vanillin, respectively. This method was successfully applied in the assay of vanillin in cold medicine.

Key words—fluorophotometry; aldehyde; condensation reaction; resorcinol; vanillin

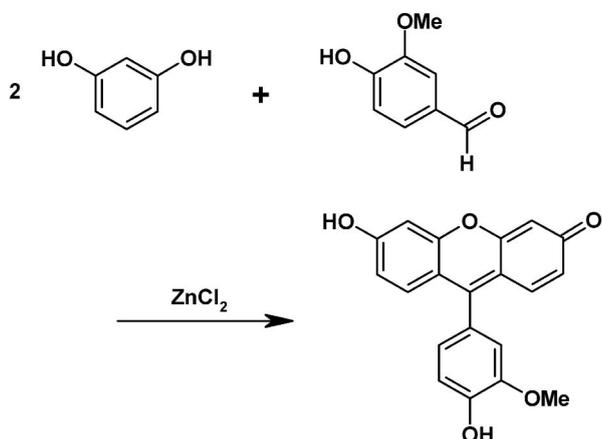
緒 言

アルデヒド類は、食品添加物や芳香剤、香料などとして汎用されているほか、抗菌作用、抗炎症作用、鎮静作用、免疫刺激作用など、種々の生理活性作用を持つ。¹⁾しかしその反面、食品用容器包装に用いられるポリエチレンテレフタレート (PET) の重合工程や成形工程の熱分解物や、リグニンやセルロースなどの天然成分の分解物、水中のアミンなどの有機物質と塩素処理、オゾン処理に用いる消毒剤との反応生成物などにより生じるアルデヒド類は大気中や土壤中、水中に拡散し、²⁾細胞原形質のタンパク質を不可逆的に凝固させ、すべての細胞機能を停止、死滅させる作用や発がん作用のほか、吸入により呼吸器などの粘膜を刺激し、咽頭充血、呼吸困難、タンパク尿などの化学物質過敏症などの元凶になるとされており、生体において興味ある化合物である。従来、アルデヒド類の分析法としては、公定法³⁻⁵⁾で規定されている DNPH 法、フクシン亜硫酸や、アセチルアセトン、テトラゾリウム塩等を用

いた比色法、⁶⁻⁸⁾ GC-MS 法、^{9,10)} 脂肪族アルデヒド類では、MBTH (3-methyl-2-benzothiazolinonehydrazone) を用いた比色法、¹¹⁾ 芳香族アルデヒド類では、2-アミノチオフェノールや 1,2-ジアミノナフタレン等の芳香族 1,2-ジアミンを用いた蛍光法^{12,13)} メンブラン法、^{14,15)} キャピラリー電気泳動法、¹⁶⁾ 化学発光法¹⁷⁾ など、種々の定量法が開発され利用されている。

一方、フルオレセインは蛍光試薬あるいは吸着指示薬として分析化学の分野で汎用されている重要な化合物であるが、一般的には、塩化亜鉛、硫酸、ポリリン酸 (PPA) などの縮合剤共存下、レゾルシノールと無水フタル酸との縮合反応によって合成される。¹⁸⁾ また、酒石酸のような 1,2-ジカルボン酸やサッカリンなどの定性試験を行う際、レゾルシノールとの反応で生成するフルオレセイン様蛍光物質により確認している場合がある。¹⁹⁾ しかしながら、レゾルシノールと縮合反応する被分析物質を検討し、それらの定量法を開発した報告はいまだみられない。

今回、生体関連化合物のうち、レゾルシノール類との反応が容易に進行すると予想されるアルデヒド類を取り上げ、これら化合物の簡便、高感度な蛍光



Scheme 1. Detection mechanism of Vanillin

分析法の開発を目的として系統的に検討した。その結果、Scheme 1 に示すように、レゾルシノールとバニリンのようなアルデヒド類との縮合反応において、塩化亜鉛あるいは硫酸を共存させると、縮合反応が加速され、効率的に発蛍光性物質が生成することを見出し、本反応を用いるバニリンをはじめとするアルデヒド類の蛍光光度定量法を確立したので報告する。

実 験

1. 試薬及び装置 バニリン溶液：バニリン（和光純薬製）をメタノール溶液に溶解（ $1 \times 10^{-1} \text{ mol l}^{-1}$ ）し、用時希釈して用いた。その他のアルデヒド類も同様に調製して用いた。

レゾルシノール溶液：レゾルシノール（和光純薬製）をメタノールに溶解（ $1 \times 10^{-1} \text{ mol l}^{-1}$ ）し、用時希釈して用いた。

塩化亜鉛溶液：塩化亜鉛（キシダ化学製）をメタノール溶液に溶解し、1.0%溶液として用いた。

その他の試薬は市販の試薬を精製せず、そのまま用いた。また、溶液の調製にはいずれも特級メタノール（ナカライテスク製）を用いた。

蛍光スペクトル及び蛍光強度の測定には、日立製 F-4500 型分光蛍光光度計で、層長 10 mm の石英製セルを用いた。旭テクノグラス社製 ALB-121 型 アルミブロック恒温槽を用いて加熱反応を行った。

2. 定量操作 共栓試験管に $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ レゾルシノールメタノール溶液 1.0 ml, 1.0% ZnCl_2 メタノール溶液 0.5 ml を加え、ついで $3.0\text{--}7600 \text{ ng ml}^{-1}$ のバニリンメタノール溶液を 0.5 ml 加え、メ

タノールで全量 2.5 ml とし、よくかく拌する。次に、共栓試験管にセミマイクロ蒸留管を付し、アルミブロック恒温槽中で、 120°C 60 分加熱反応させたのち、一定量のメタノールで蒸留管をよく洗浄し、洗液とともに全量 10 ml の試料溶液とする。次に、同様に処理して得た空試験溶液（Blank）と試料溶液（Sample）の蛍光強度をそれぞれ励起波長 410 nm, 蛍光波長 507 nm で測定した値を S 及び B とし、蛍光強度差 $[\text{RFI} = (\text{S} - \text{B}) / \text{B}]$ の値を求めた検量線よりバニリン濃度を求める。

実 験 結 果

1. アルデヒドの選定及び反応化学種の検討

予備的検討として、レゾルシノールと縮合反応するアルデヒド類を選定する目的で、バニリン、エチルバニリン、アニスアルデヒド、シナナムアルデヒド、アミルシナナムアルデヒド、ペリラルデヒド、シトロネラル、フルフラール、ベンズアルデヒド、プロピオンアルデヒド、ピリドキサルなど種々のアルデヒド類を比較検討した。その結果、芳香族アルデヒド類、特にバニリンにおいて高い蛍光強度を示す蛍光物質が生成することを認めた。したがって、本実験においては、アルデヒド類として、化学的に安定で用途が広いバニリンを選定した。次に、アルデヒドのバニリンと縮合反応をする反応化学種であるレゾルシノール誘導体について、種々検討した。レゾルシノール誘導体としては、レゾルシノール、2-メチルレゾルシノール、4-ブromoレゾルシノール、フロログルシノールについて検討した。その結果、本反応においては、レゾルシノールを反応させたとき Sample の縮合生成物が高い蛍光強度を示し、RFI が最大値を示したので、レゾルシノールを用いた。

2. 反応時の縮合剤の検討 レゾルシノールとアルデヒド類の縮合反応は、縮合剤共存下ではその反応が加速される。また、縮合剤の種類によっては生成する蛍光物質の化学種が相違し、生成率も変化すると考えられるので、レゾルシノールとバニリンとの縮合反応時における縮合剤について検討した。その結果、Table 1 に示すように、メタンスルホン酸、リン酸、ポリリン酸（PPA）、硫酸、塩化亜鉛、塩化アルミニウム、酸化亜鉛などのうち塩化亜鉛、塩化アルミニウムのような金属塩を用いると

Table 1. Effect of Condensation Agents

Condensation agents	RFI
ZnCl ₂	6.11
AlCl ₃	5.98
PPA	0.12
CH ₃ SO ₃ H	1.87
H ₂ SO ₄	0.01
ZnO	0.85

Vanillin: 76 ng ml⁻¹, resorcinol: 1.0×10⁻³ mol l⁻¹, condensing agents: 0.05% solution, EX: 410 nm, EM: 507 nm.

き、高い蛍光強度を示した。今回は、メタノールへの溶解性及び低濃度バニリンの定量性の面で優れている塩化亜鉛を用いることにした。

3. 塩化亜鉛濃度の検討 塩化亜鉛 (ZnCl₂) 濃度としては、1.0% ZnCl₂ メタノール溶液を 0.25–2.0 ml 添加した結果、0.5 ml 付近で最も高い蛍光強度を得た。したがって、以下の操作は、1.0% の ZnCl₂ メタノール液を 0.5 ml 添加することにした。

4. レゾルシノール濃度の検討 用いるレゾルシノール濃度を検討したところ、1.0×10⁻³–1.0×10⁻¹ mol l⁻¹ のそれぞれを 1.0 ml 添加した結果、1.0×10⁻² mol l⁻¹ レゾルシノール 1.0 ml 付近で最も高い蛍光強度を得ることができた。したがって、以下の操作には、1.0×10⁻² mol l⁻¹ のレゾルシノールメタノール溶液を 1.0 ml 加えることにした。

5. 反応温度と反応時間の検討 本縮合反応における反応温度として 110–170°C の範囲を、反応時間としては、分析操作の迅速性、簡便性を考慮し、60 分以内の加熱時間を選び検討した結果、加熱温度が 120°C において縮合生成物の蛍光強度が最大であり、室温放置後の溶媒への溶解性にも優れていた。さらに、反応時間として 30–120 分を選定し、反応温度 120°C において再度加熱時間を検討した結果、60 分間加熱反応させるとき、縮合生成物の RFI が最大になった。したがって、以下の操作は、加熱温度 120°C、加熱反応時間 60 分を用いることにした。

6. 蛍光スペクトルの測定 定量操作にしたがって、Blank 及び Sample の蛍光スペクトルを測定した。その結果、Fig. 1 に示すように、バニリン濃度の増加に従い、蛍光波長 507 nm 付近に蛍光極大スペクトルの出現が認められた。本反応は、Scheme 1 に示す反応機構を経ると推察され、本蛍

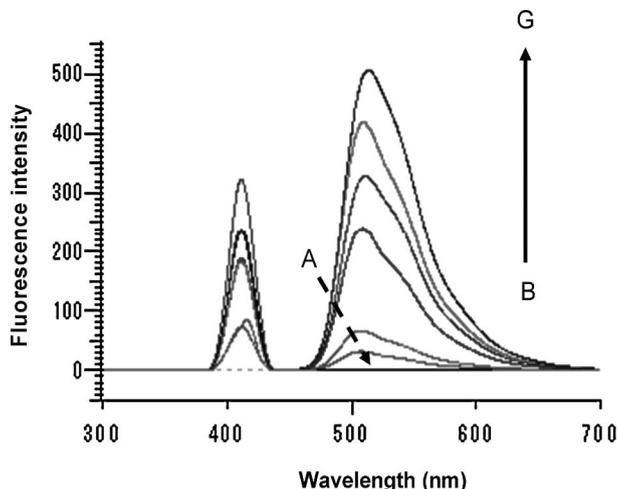


Fig. 1. Fluorescence Emission Spectra of Sample and Blank Solution

A: blank solution, B–G: reaction solution of resorcinol with vanillin (38, 76, 190, 380, 570, 760 ng ml⁻¹, respectively). Resorcinol: 1.0×10⁻³ mol l⁻¹, ZnCl₂ 0.05% solution, EX: 410 nm, EM: 507 nm.

光スペクトルから発蛍光物質がフルオレセイン様物質であることを認めた。

7. 検量線の作成 定量操作に従ってバニリンの検量線を作成したところ、バニリン 3.0–7600 ng ml⁻¹ と非常に広い濃度範囲で、相関係数が $r = 0.999$ と高い相関を示す良好な直線を得ることができた。また、バニリン濃度 7.6 ng ml⁻¹, 760 ng ml⁻¹ での相対標準偏差 (RSD) は、 $RSD = 2.5\%$ ($n = 5$), $RSD = 2.0\%$ ($n = 5$) と再現性にも優れていた。本法は、報告されている比色法、メンブラン法^{10,11)}の 1000 倍、キャピラリー電気泳動法¹²⁾の約 600 倍、化学発光法¹³⁾の約 20 倍を示し、また芳香族 1,2-ジアミン等を用いた蛍光分析法、GC-MS 法と比べほぼ同等の定量感度を示すとともに、操作法が簡便であり、定量範囲は極めて広く、再現性にも優れている。

8. 共存物質の影響 本法を実試料への適用を目的として、それに伴う影響が予想される共存物質について、バニリン 7.6 ng ml⁻¹ において検索した。その結果、Table 2 に示すように、陽イオン、陰イオンの共存物質について検討を行った結果、多量共存下においても比較的妨害が少ないことを認めた。さらにビタミン類、クエン酸、シュウ酸、カフェイン、グルコース、アミン類などの有機化合物の共存についても検討したが、いずれも妨害が小さいことを認めた。さらに、尿素、メチルセルロース、

Table 2. Effect of Foreign Substances on Determination of Vanillin

Substance	ng ml ⁻¹	Mole ratio	Recovery (%)
None	—	—	100.0
Cu (II)	6.4×10 ²	20	150.0
Fe (II)	2.8×10 ³	100	95.0
Ca (II)	1.0×10 ³	50	99.6
Al (III)	1.4×10 ³	100	103.8
NaCl	2.9×10 ³	100	106.7
NH ₄ Cl	2.7×10 ³	100	96.7
NaF	2.1×10 ³	100	92.6
KI	8.3×10 ³	100	105.6
KNO ₃	5.1×10 ³	100	84.1
Na ₂ CO ₃	5.3×10 ³	100	107.4
K ₃ PO ₄	1.1×10 ⁴	100	97.0
Thiamine	1.5×10 ⁴	100	111.6
Rivoflavin	1.9×10 ³	10	107.9
Ascorbic acid	8.8×10 ²	10	100.1
Citric acid	9.6×10 ³	100	94.1
Oxalic acid	6.6×10 ³	100	103.0
Caffeine	1.1×10 ⁴	100	100.0
Glucose	9.0×10 ³	100	100.7
Glycine	3.8×10 ³	100	104.7
Cystein	6.1×10 ²	10	95.5
Urea	3.5×10 ⁵	250	112.6
Methyl cellulose	1.2×10 ⁸	—	117.8
Starch	1.1×10 ⁸	—	100.0
HSA	1.3×10 ⁸	—	112.7
Benzoic acid	6.1×10 ³	100	114.9
2,4-hydroxybenzoic acid	5.8×10 ³	75	96.7
<i>m</i> -Formylbenzoic acid	7.5×10 ²	10	99.3
Methylbenzoic acid	6.8×10 ³	100	100.0
Benzyl alcohol	1.1×10 ⁴	125	101.0
Acetic acid	2.3×10 ³	75	99.5
Formaldehyde	1.5×10 ³	100	—*
Benzaldehyde	5.3×10 ³	100	—*

Vanillin: 7.6 ng ml⁻¹, resorcinol: 1.0×10⁻³ mol l⁻¹, ZnCl₂: 0.05% solution, EX: 410 nm, EM: 507 nm. * undetermined.

タンパク質 (ヒト血清アルブミン, HSA) などの共存についても比較的妨害がなく, 良好な結果を得ることができた. なお, ホルミル基を含まないバニリン類似構造の芳香族化合物の共存もほとんど影響がみられなかったが, アルデヒド類のホルムアルデヒド, ベンズアルデヒドの共存は, メタノール不溶性生成物が生成し妨害した.

9. 他のアルデヒド類の反応性 バニリン以外のアルデヒド類についてバニリンの定量操作を用い検量線を作成した. Table 3 に示すように芳香族ア

Table 3. Determination of Aldehydes

Sample	Concentration range (ng ml ⁻¹)	DL ^{a)} (ng ml ⁻¹)	Correlation coefficient
Vanillin	3.0–7600	1.63	0.999
<i>p</i> -Dimethylaminobenzaldehyde	9.2–2000	1.85	0.999
Propionaldehyde	10.0–1000	2.18	0.999
Ethylvanillin	16.0–8300	3.89	0.993

Resorcinol: 1.0×10⁻³ mol l⁻¹, ZnCl₂: 0.05% solution, EX: 410 nm, EM: 507 nm. a) Detection limit=3.3 σ/slope.

Table 4. Analytical Results of Vanillin in Cold Medicine

Sample	Content/mg		RSD* ² (%)	Recovery* ² (%)
	Nominal amount	Present method		
A* ¹	0.52	0.50	7.4	109.1

Sample A: Ingredients-vanillin, acetaminophen, *d*-methyl ephedrine hydrochloride, anhydrous caffeine, glycyrrhetic acid, cinnamic acid, gingerol, phylloquin, *l*-menthol, *d*-borneol, eugenol, anhydrous calcium hydrogen phosphate. *¹: An aliquot of powder exactly weighted, was dissolved in methanol by means of shaking, the solution was filtered, and then the vanillin was determined by the standard procedure, *²: mean of 5 determinations.

ルデヒド類のアミルシンナムアルデヒド, エチルバニリン, *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド, フルフラール, ペリルアルデヒド, ピリドキサル, 脂肪族アルデヒドのプロピオンアルデヒドなどを検討した. 類似構造を示す芳香族のアルデヒド類のエチルバニリン, *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド, 脂肪族のアルデヒド類のプロピオンアルデヒドなどにおいてもバニリンとほぼ同等の感度で検量線を作成することができたが, アミルシンナムアルデヒド, ピリドキサルなどにおいては十分な感度を得ることができなかった. 今後, これらについてはバニリンの定量操作とは異なる分析条件の設定が必要であると考えられる.

10. 実試料への応用 本法の実試料への応用として, 市販のかぜ薬を用いて検討した. その結果を Table 4 に示すが, 添加回収率 109.1% (*n*=5), 5 回での相対標準偏差 (RSD) は, 7.4% という結果が得られた. 本法はこのような多成分を含有する複合製剤中においてもバニリンの定量が可能であり, バニリンをはじめ実試料中のアルデヒド類の測定に十分適用できると考えられる.

考 察

レゾルシノールとアルデヒド類との縮合反応の際、塩化亜鉛を触媒として共存させると、縮合反応が加速され、効率的に発蛍光物質が生成することを見い出した (Scheme 1)。バニリンの場合、本反応の利用により、 $3.0\text{--}7600\text{ ng ml}^{-1}$ とダイナミックレンジの広い濃度範囲のバニリンを励起波長 410 nm 、蛍光波長 507 nm で蛍光光度定量することができた。本法は、共存物質の影響も少なく再現精度にも優れた、簡便・高感度なバニリン測定法である。本法を市販複合製剤 (かぜ薬) 中のバニリン分析に応用したところ、測定値、回収率とも良好な結果が得られ、実試料中のバニリン測定法として十分適用できることが示唆された。

REFERENCES

- 1) Japan Food Additives Association, JSFA-VII, D-1040 (1999).
- 2) Ookado Y., Kawamura Y., Tanamoto K., *Syokueishi*, **46**, 218 (2005).
- 3) US Environmental Protection Agency, EPA Method, TO-11 (1988).
- 4) Japanese Standards Association, JIS K 0303 (2004).
- 5) Kankyotyoutaikihozenkyokukiseika, Yuugai-taikiosenbussitsusokuteihou Manual, (1997).
- 6) The Vitamin Society of Japan, Vitamin and Medicine (1998).
- 7) Sherif E. I., Walash M.I., Osman A., *Anal. Lett.*, **30**, 1881 (1997).
- 8) Shannnon S. K., Barany G., *J. Comb. Chem.*, **6**, 165 (2004).
- 9) Glaze W. H., Koga M., Cancilla D., *Environ. Sci. Technol.*, **23**, 838-847 (1989).
- 10) Sugaya N., Nakagawa T., Sakurai K., *J. Health Sci.*, **47**, 21-27 (2001).
- 11) "Bunsekikagaku Handbook," Asakura syoten, (2002).
- 12) Katayama M., Mukai Y., Taniguchi H., *Anal. Sci.*, **3**, 565 (1987).
- 13) Hara S., Nakamura M., Yamaguchi M., *Anal. Chim. Acta*, **291**, 189 (1994).
- 14) Qureshi M., Qureshi S., Singhal S.C., *Anal. Chim. Acta*, **53**, 361 (1971).
- 15) Luque M., Perez E. L., Valcarcel M., *Anal. Chim. Acta*, **410**, 127 (2000).
- 16) Ohashi M., Omae H., Imai S., *J. Chromatogr. A*, **1138**, 262 (2007).
- 17) Potamia M. T., Calokerinis A., *Talanta*, **71**, 208 (2007).
- 18) Nihonyakkyokuhokaisetsusyohensyuiin, JP 15, C, 3654-3658 (2001).
- 19) Japan Food Additives Association, JSFA-VII, 266 (1999).